

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000020

International filing date: 06 January 2005 (06.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR  
Number: 0400090  
Filing date: 07 January 2004 (07.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 March 2005 (30.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 13 JAN. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', enclosed within a large, stylized oval loop.

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI\*



## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 • 11 / 210502

REMISE EN BROSURE DATE <b>7 JAN 2004</b> LIEU <b>75 INPI PARIS 34 SP</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>- 7 JAN. 2004</b> Vos références pour ce dossier (facultatif) <b>SGimF1708/2FR</b>		Réservé à l'INPI <b>1</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 36, rue de St Pétersbourg 75008 PARIS	
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		<input type="checkbox"/>	
		N°	Date
<b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) UTILISATION DE FIBRES VEGETALES MICRONISEES POUR LA PREPARATION D'UNE COMPOSITION ALIMENTAIRE DESTINEE A DIMINUER LA BIODISPONIBILITE DES MYCOTOXINES			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b> (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		REALDYME	
Prénoms			
Forme juridique		Société anonyme	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	"La Haute-Epine"	
	Code postal et ville	12 87 10 01 GARANCIERES-EN-BEAUCE	
	Pays	France	
Nationalité		02 37 24 61 65	
N° de téléphone (facultatif)		02 37 24 67 73 N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)		realdym@aol.com	
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

**BR2**

7 JAN 2004 Réservé à l'INPI  
 REMISE DES RUBRIQUES  
 DATE 75 INPI PARIS 34 SP  
 LIEU 0400090  
 N° D'ENREGISTREMENT  
 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		
Nom	GOULARD	
Prénom	Sophie	
Cabinet ou Société	CABINET ORES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	36, rue de St Pétersbourg
	Code postal et ville	75 010 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)	01 53 21 11 00	
N° de télécopie (facultatif)	01 53 21 08 88	
Adresse électronique (facultatif)	ores@cabinet-ores.com	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : RG [ ]
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		

**11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**

\_\_\_\_\_  
 Lieu et date de signature

**12 SIGNATURE DE LA PREFECTURE**  
 (à compléter)

La présente Invention est relative à l'utilisation de fibres végétales micronisées pour la préparation d'une composition alimentaire destinée à diminuer la biodisponibilité des mycotoxines.

5 L'importance de l'innocuité des aliments pour la sécurité alimentaire a été largement reconnue, en particulier par les divers gouvernements qui ont participé en 1992 à la Conférence Internationale sur la Nutrition ("*International Conference on Nutrition*") qui s'est déroulée à Rome (Italie) et en 1996 au Sommet Mondial sur l'Alimentation ("*World Food Summit*") de Rome (Italie).

10 La qualité et la sécurité des aliments peuvent être menacées par un grand nombre de facteurs, y compris par la présence de toxines naturelles. En effet, parmi la longue liste de toxines pouvant naturellement se retrouver dans les produits d'alimentation courante, les mycotoxines représentent une catégorie très importante qui figure parmi les plus étudiées dans la mesure où leur ubiquité et leurs effets néfastes sur la santé humaine et animale provoquent une inquiétude générale (FAO, 15 1999, "*Preventing Mycotoxin contamination*", Publication n°23, Rome, Italie, p 55).

Les produits agricoles sont les cibles potentielles de ravageurs et de maladies. Ils portent une flore microbienne variable et nombreuse comprenant principalement des bactéries, des levures et des champignons filamenteux. Leur présence peut notamment provoquer une détérioration de la qualité des produits 20 agricoles, allant parfois jusqu'à leur destruction pure et simple. Parmi ces microorganismes, certains champignons filamenteux sont responsables de la production des mycotoxines, qui s'observe au cours de la croissance des produits agricoles dans les champs ou bien au cours de leur stockage dans des conditions propices d'humidité et de température. Les principaux genres de champignons (*fungi*) 25 producteurs de mycotoxines sont *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* et *Alternaria*.

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de composition chimique très variable, mais en général de faible poids moléculaire. Leurs effets néfastes sur la santé humaine, qu'ils soient aigus ou chroniques, sont aussi très variés. Leurs cibles sont principalement les reins, le foie, le tractus gastro-intestinal et les 30 systèmes nerveux et immunitaires. A ce jour, environ cinq cents mycotoxines ont été découvertes et leur nombre ne cesse d'augmenter au fur et à mesure que la recherche avance. Toutefois, seule une vingtaine sont bien identifiées comme une menace réelle

pour la sécurité alimentaire. Parmi les différentes familles de mycotoxines rencontrées dans les produits alimentaires, on peut notamment citer les Aflatoxines (AFLA), les toxines de l'ergot, les Fumonisines (FB), l'Ochratoxine A (OTA), la Patuline (PAT), la Stérigmatocystine, la Zéaralénone (ZEA) et les Trichotécènes dont le déoxynivalénol (DON). En fonction de leur nature, ces mycotoxines peuvent avoir des effets néfastes divers sur la santé humaine ou animale ; elles peuvent notamment être hépato et immunotoxiques, carcinogènes, tératogènes, neurotoxiques, néphrotoxiques, ou bien encore entraîner des troubles digestifs ou des hémorragies.

Les principales denrées alimentaires susceptibles d'être contaminées par les mycotoxines sont les céréales, les noix, les fruits secs, le café, le cacao, les épices, les graines oléagineuses, les pois et les fèves, ainsi que les fruits. Leurs produits dérivés peuvent donc être contaminés, suivant la stabilité de la toxine au cours du processus de transformation. Il en résulte que ces mycotoxines, et notamment l'OTA, peuvent être transmises à de nombreux produits de consommation animale ou humaine tels que les farines animales, le vin, la bière, le pain et les produits dérivés du café et du cacao (Abarca ML. *et al.*, J. Food Prot., 2001, 64(6), 903-906 ; Walker R., Adv. Exp. Med. Biol., 2002, 504, 249-255). Il existe également un risque non négligeable de contamination secondaire *via* certaines denrées d'origine animale comme la viande et les abats d'animaux monogastriques (Pittet A., Rev. Méd. Vét., 1998, 149, 479-492).

Les mycotoxines sont des composés très stables et résistants à la majorité des processus de transformation des produits agro-alimentaires. Par conséquent, et compte tenu de leurs effets néfastes sur la santé, il est de la plus grande importance de pouvoir disposer de moyens efficaces permettant :

- soit de prévenir la contamination des produits alimentaires,
- soit de les décontaminer avant et/ou après leur transformation.

La première approche n'est pas toujours réalisable compte tenu des conditions de culture ou de stockage des matières premières.

La deuxième approche doit donc être mise en œuvre au niveau des procédés de transformation agro-alimentaire. La décontamination des produits agro-alimentaires peut être réalisée par des procédés physico-chimiques ou biologiques. Les procédés physico-chimiques sont basés sur l'utilisation de produits chimiques ou de rayonnements ionisants. Les procédés biologiques sont basés sur l'utilisation de micro-organismes ou d'enzymes.

1) la première catégorie consiste à dégrader les toxines en des produits moins toxiques ou non toxiques afin que leur ingestion soit moins préjudiciable à l'organisme ;

2) la deuxième catégorie consiste à soumettre l'aliment à une étape de microfiltration. A titre d'exemple, on peut notamment citer le brevet américain n° 5,248,382 qui décrit une méthode pour réduire le taux de mycotoxines dans les jus de fruits, et en particulier le taux de patuline, au moyen d'une filtration sur une résine microporeuse capable de retenir la patuline par chémisorption et dans laquelle le diamètre des pores est inférieur à 20 Angström. Bien qu'efficace, cette méthode présente l'inconvénient de mettre en œuvre un matériel spécifique et coûteux et de n'être applicable qu'à des produits alimentaires se présentant sous une forme liquide ;

3) la troisième catégorie consiste à utiliser des adsorbants afin de retenir, au moins en partie, les mycotoxines. Ces adsorbants sont soit ajoutés au cours de la fabrication des produits alimentaires puis éliminés de ceux-ci avant consommation (généralement par filtration) afin de réduire la teneur en mycotoxines dans l'aliment final ; soit ajoutés aux aliments consommés pour diminuer la biodisponibilité des mycotoxines lors de la digestion.

Dans les nombreux documents de l'art antérieur décrivant des procédés appartenant à cette troisième catégorie, les mycotoxines sont éliminées par l'action d'adsorbants non biologiques, généralement inorganiques.

Parmi de tels adsorbants inorganiques, il a notamment déjà été proposé d'utiliser :

- les aluminosilicates sodiocalciques hydratés (HSCAS) qui sont capables d'adsorber des aflatoxines présentes dans un milieu. Cependant leur effet est moindre vis-à-vis de l'OTA (Huwig A. *et al.*, Tox. Letters, 2001, 122, 179-188) ;

- les phyllosilicates (Diaz D. E. *et al.*, J. Dairy Sci., 1999, 82 (suppl. 1), 838 ;

- les charbons actifs pour lesquels des tests *in vivo* montrent un effet préventif vis-à-vis des aflatoxicoses et une augmentation des performances des animaux lorsqu'ils sont nourris avec des aliments contaminés (Galvano *et al.*, J. Food Prot., 1997, 60, 985-991) de même qu'une diminution de la teneur en OTA dans les tissus, le sang et la bile des animaux suite à l'incorporation de l'adsorbant dans les

régimes (Ramos A. J. et Hernandez E., *Animal Feed Science and Technology*, 1997, 62, 263-269 ; Huwig *et al.*, 2001, pré-cité) ;

- les résines telles que la cholestyramine et la polyvinylpyrrolidone qui sont également capables de fixer l'OTA (Piva A. et Galvano F., 1999, "Nutritional approaches to reduce the impact of mycotoxins", *Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium*, T. P. Lyons et K.A. Jacques (eds.), 381-400, Nottingham University Press, Nottingham, UK).

En revanche, les études *in vivo* ne révèlent pas une protection systématique de ces adsorbants vis-à-vis de la toxicité des mycotoxines et en particulier de l'OTA. En effet, l'étude réalisée par Bauer J. (*Monatsh Veterinarmed*, 1994, 49, 175-181) n'a démontré aucune réduction de la concentration sanguine et tissulaire de l'OTA chez des pigeons, lorsque l'ingestion d'aliments contaminés par cette toxine était associée à la prise de bentonite (demande de brevet allemand DE 3 810 004), de HSCAS, de cholestyramine ou de parois de levures. Les mêmes observations ont été faites par Scheideler S. E. (*Poultry Science*, 1993, 72, 282-288) et Ledoux D. R. *et al.*, 2001 ("In vitro binding mycotoxins by adsorbents does not always translate into *in vivo* efficacy.", In : *Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium. Proceedings of the X<sup>th</sup> International IUPAC Symposium in Mycotoxins and Phycotoxins*, édité par W. J. de Koe, R. A. Samson, H. P. Van Egmond, J. Gilbert et M. Sabino, Wageningen, The Netherlands, 279-287). Plus récemment, Santin E. *et al.* (*J. Appl. Poultry Res.*, 2002, 11(1), 22-28) ont démontré que l'addition de HSCAS à la dose de 0,25 % n'améliore guère l'impact négatif de l'OTA (2 ppm) sur les paramètres physiologiques chez des poulets.

Par ailleurs, les ligands mentionnés ci-dessus peuvent occasionner des pertes d'éléments nutritifs et des modifications de la qualité organoleptique des aliments.

De plus, il reste que l'élimination totale des mycotoxines est impossible. C'est pourquoi il semble important de compléter le panel des mesures préventives et correctives exposées précédemment par l'emploi d'agents inefficaces pour l'élimination et absorbables d'un point de vue organoleptique, qui restent capables de limiter la contamination des aliments.



Les Inventeurs se sont donnés pour but de pourvoir à une méthode biologique de détoxication de milieux alimentaires permettant de remédier à l'ensemble de ces inconvénients, et qui conduit à une diminution de la biodisponibilité des mycotoxines après ingestion de produits alimentaires contaminés.

5 A cette occasion, les Inventeurs ont mis en évidence, de façon surprenante, que la capacité d'adsorption de fibres végétales micronisées essentiellement insolubles vis-à-vis des mycotoxines peut être mise à profit afin de préparer une composition alimentaire capable de diminuer de façon significative la biodisponibilité des mycotoxines susceptibles d'être présentes dans les produits  
10 alimentaires ingérés.

La présente Invention a donc pour objet l'utilisation de fibres végétales micronisées et essentiellement insolubles à titre d'ingrédient dans la préparation d'une composition alimentaire destinée à diminuer la biodisponibilité des mycotoxines chez l'homme ou l'animal lors de l'ingestion d'un aliment susceptible  
15 d'être contaminé par lesdites mycotoxines.

Les Inventeurs ont en effet observé que la capacité d'adsorption *in vitro* de ces fibres végétales micronisées vis-à-vis des mycotoxines se maintient *in vivo* et permet de diminuer la biodisponibilité et par voie de conséquence les effets néfastes des mycotoxines après ingestion dans l'organisme. Les Inventeurs ont par  
20 ailleurs constaté, lors d'expériences réalisées *in vitro*, que l'utilisation de la micronisation permettait d'augmenter de façon significative la capacité d'adsorption des fibres végétales vis-à-vis des mycotoxines par rapport aux fibres végétales non micronisées.

Selon l'Invention, on entend par "essentiellement insoluble", une  
25 solubilité dans l'eau inférieure ou égale à 15 % en poids. Par ailleurs, dans la description détaillée qui va suivre et sauf indication contraire de façon explicite, les termes "fibres végétales" font référence aux fibres végétales micronisées essentiellement insolubles utilisables dans le cadre de l'Invention.

Selon une forme de réalisation avantageuse de l'Invention, ladite  
30 composition alimentaire est plus particulièrement destinée à diminuer la biodisponibilité des mycotoxines hydrophobes, les Inventeurs ayant en effet constaté

que les mycotoxines hydrophobes ont une plus grande affinité pour les fibres végétales que les mycotoxines hydrophiles.

Selon une forme de réalisation de l'Invention, les fibres végétales sont choisies parmi les fibres issues :

- 5                   - de végétaux alimentaires choisis parmi les céréales, les légumineuses, les plantes potagères, les fruits y compris tropicaux, et plus généralement toute plante utilisée à des fins alimentaires,
- de végétaux utilisés par l'industrie du papier tels que les arbres, la canne à sucre, le bambou et la paille de céréale.

10                   Parmi les fibres végétales issues de céréales, on peut en particulier citer les fibres de blé, d'orge, d'avoine, de maïs, de millet, de riz, de seigle, de sorgho, et leurs équivalents maltés.

                  Selon l'invention, on entend par équivalent malté les grains germés dont la germination a été stoppée par un traitement thermique et qui ont ensuite été  
15 débarrassés de leurs germes.

                  Parmi les fibres issues de végétaux alimentaires autres que les céréales, on peut notamment citer les fibres issues des pommes, des poires, des grains de raisins, des graines de lupin et de soja, des tomates, des pois, du café, etc.

                  Parmi ces fibres végétales, on préfère tout particulièrement :

- 20                   - les fibres de blé micronisées vendues sous les dénominations commerciales Realdyme® et Realdyme® M ;
- les fibres d'avoine micronisées vendues sous la dénomination commerciale Realdyme® FB ;
- les fibres d'orges micronisées vendues sous le dénomination  
25 commerciale Realdyme® O, et en particulier le Realdyme® OF et le Realdyme® OM.

                  Toutes ces fibres sont disponibles auprès de la société REALDYME (Garancières en Beauce, La Haute Epine, France).

                  Les fibres végétales utilisables conformément à l'invention se caractérisent par la présence sous la forme de microparticules d'une 50 à 100 microns en poids et d'une longueur comprise entre 10 et 100 microns, et d'un diamètre moyen compris entre 10 et 100 microns.

mesurée par tamisage sur un tamis A 200 LS Air Jet Sieve commercialisé par la société Alpine (Augsburg, Allemagne). De telles fibres peuvent notamment être préparées selon le procédé décrit dans la demande de brevet FR 2 433 910.

La nature des fibres utilisées conformément à l'Invention est de  
5 préférence choisie en fonction de la nature de la ou des mycotoxines susceptibles d'être présentes dans le milieu alimentaire et dont on veut diminuer la biodisponibilité après ingestion.

Ainsi, lorsque la composition alimentaire est principalement destinée à diminuer la biodisponibilité de l'Ochratoxine A, des aflatoxines, de la  
10 Fumonisine et/ou du déoxynivalénol, alors les fibres végétales seront préférentiellement choisies parmi les fibres de blé micronisées telles que les produits Realdyme® et Realdyme® M, les fibres d'avoine micronisées telles que par exemple le produit Realdyme® FB et leurs mélanges. Selon l'Invention, et en ce qui concerne la diminution de la biodisponibilité de l'Ochratoxine A, on préfère tout  
15 particulièrement utiliser des fibres végétales telles que Realdyme® M, qui sont des fibres de blé micronisées sous forme de microparticules dont 67 % en poids présentent une taille inférieure à 75 µm.

La composition alimentaire utilisable selon l'Invention est destinée aussi bien à l'alimentation animale qu'à l'alimentation humaine.

20 La composition alimentaire conforme à l'Invention peut se présenter sous plusieurs formes telles qu'un complément alimentaire, un ingrédient alimentaire (ou produit alimentaire intermédiaire : PAI) ou une matière première.

Lorsque la composition alimentaire conforme à l'invention se présente sous la forme d'un complément alimentaire, alors la quantité de fibres  
25 végétales micronisées au sein dudit complément peut représenter jusqu'à 100 % en poids du poids total dudit complément ; cette quantité étant préférentiellement comprise entre 80 et 100 % en poids.

Lorsque la composition alimentaire se présente sous la forme d'un PAI, elle est alors de préférence destinée à l'alimentation humaine et est utilisée à titre  
30 d'ingrédient au cours de la fabrication d'un produit alimentaire susceptible d'être contaminé par des mycotoxines. Dans ce cas, la composition alimentaire représente alors de 0,1 à 40 % en poids et encore plus préférentiellement de 1 à 20 % en poids

par rapport au poids total du produit alimentaire fini.

Lorsque la composition alimentaire se présente sous la forme d'une matière première, elle est de préférence destinée à l'alimentation animale. La composition alimentaire peut alors être ajoutée à la ration alimentaire journalière qui est donnée aux animaux domestiques ou d'élevage et qui est susceptible d'être contaminée par des mycotoxines, et ce avant ingestion de ladite ration. Elle peut également être utilisée à titre de matière première ou d'additif au cours de la fabrication d'un aliment complet pour animaux domestiques ou d'élevage. Dans ces deux derniers cas, la composition alimentaire représente alors de préférence de 0,5 à 20 % en poids et encore plus préférentiellement de 2 à 5 % en poids par rapport au poids total de la ration alimentaire ou de l'aliment complet.

Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à un exemple de mise en évidence de la capacité d'adsorption d'OTA par des fibres végétales insolubles et criblage préliminaire de différentes fibres végétales, à un exemple d'étude de l'effet des variations de pH sur l'adsorption d'OTA dans un milieu liquide modèle, à un exemple de mise en évidence de l'adsorption des aflatoxines totales par des fibres végétales insolubles dans un milieu liquide modèle et à un exemple d'étude de l'effet de l'incorporation de fibres de blé micronisées dans un régime alimentaire contaminé par de l'OTA donné à des rats sur la diminution de la biodisponibilité de l'OTA, ainsi qu'aux figures 1 à 3 annexées dans lesquelles :

- la figure 1 représente l'évolution de l'adsorption d'OTA par trois fibres différentes (Realdyme® M : croix ; Realdyme® OF e : ronds pleins et Realdyme® OM : triangles vides) en milieu liquide modèle contenant une concentration initiale de 30 ng d'OTA/ml pour un volume initial de 25 ml et une durée de mise en contact de 45 minutes en fonction de la quantité de fibres en grammes par litre de milieu ;

- la figure 2 représente l'évolution de l'adsorption d'OTA (diminution de la quantité d'OTA en pourcentage de la quantité initialement présente) dans un milieu liquide modèle par des fibres Realdyme® en fonction des variations de pH ;

- la figure 3 représente :

\* en A : la quantité cumulée de matières fécales éliminées (en g/semaines) en fonction des semaines chez des rats ayant reçu différents régimes alimentaires contaminés ou non en OTA et supplémentés ou non par des fibres de blé micronisées (barres grises : régime 1 = ration alimentaire non contaminée par de l'OTA ; barres hachurées : régime 2 = ration alimentaire contaminée par de l'OTA et barres pointillées : régime 3 = ration alimentaire contaminée par de l'OTA et supplémentée par des fibres de blé micronisées) ;

\* en B : la variation relative de la quantité de matières fécales éliminées (en %) par rapport à celle observée pour les rats ayant reçu le régime 1, en fonction des semaines (barres grises : régime 2 ; barres hachurées : régime 3).

#### **EXEMPLE 1 : MISE EN EVIDENCE DE LA CAPACITE D'ADSORPTION D'OTA PAR DES FIBRES VEGETALES ET CRIBLAGE PRELIMINAIRE DE DIFFERENTES FIBRES VEGETALES**

De façon surprenante, les Inventeurs ont mis en évidence que l'incorporation de fibres végétales micronisées dans un milieu liquide modèle permet, par l'adsorption de l'OTA sur les fibres, de diminuer la quantité de mycotoxines disponible dans ce milieu. Les tests *in vitro* reportés dans cet exemple ont été réalisés afin de démontrer la capacité d'adsorption de fibres végétales micronisées lorsqu'elles sont incorporées dans un milieu liquide contaminé en OTA et afin de déterminer quel est le temps de mise en contact nécessaire à une adsorption optimale de l'OTA par ces fibres. Ensuite, un criblage de trois fibres végétales différentes a été réalisé afin de déterminer quelles étaient les fibres les plus performantes vis-à-vis de l'adsorption de l'OTA. La capacité d'adsorption du Realdyme ® M a par ailleurs été comparée à celle de la matière première non micronisée (fibres de blé non micronisées).

##### **1) Protocole expérimental**

Une quantité déterminée de fibres végétales (environ 20 g/l) est mélangée dans un tube stérile de 50 ml avec 25 ml d'une solution aqueuse renfermant 2 % de Dextrose (vendu sous la dénomination commerciale D(+) glucose monohydraté par la société Merck), 5 % d'extrait de levures (vendu sous la dénomination commerciale Extrait de levures en Poudre par la société ICN Biomedical) et 1 % de peptone (vendu sous la dénomination Peptone par la société

Duchefa), préalablement stérilisée à 121°C pendant 15 minutes. Cette solution aqueuse présente un pH compris entre 6,0 et 6,2 et est dénommée "DYP" dans ce qui suit (milieu modèle). La solution DYP est ensuite contaminée par une quantité variable d'une solution d'OTA dans l'éthanol. La concentration d'OTA dans le milieu

5 liquide modèle est de 57 ng/ml. Le contenu du tube est ensuite homogénéisé par agitation manuelle pendant 30 secondes, puis le tube est placé à agiter à 90 tours par minute (tpm) dans une chambre thermostatée à 25°C pendant 45 minutes. Un traitement contrôle sans adsorbant (témoin), c'est-à-dire sans fibre végétale, est effectué pour chaque expérience, et chacune de ces expériences est réalisée trois fois.

10 La suspension est ensuite centrifugée à 1830 g pendant 10 minutes à une température de 25°C puis le culot est séparé du surnageant. On extrait ensuite 1 ml de surnageant dans un tube stérile par 9 ml d'une solution de méthanol : eau (50 : 50 ; v/v). Le tube est ensuite vortexé pendant 30 secondes, puis centrifugé pendant 10 minutes à 820g à une température comprise entre 5 et 10°C. Cet extrait est ensuite

15 dilué, filtré et analysé par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Le système HPLC consiste en une pompe à régime isocratique Perkin Elmer® LC049 vendue par la société Norwalk (USA) avec une boucle d'injection de 50 µl vendue sous la dénomination Rheodyne® par la société Cotati (USA), équipée d'une colonne C<sub>18</sub> d'une longueur de 150 mm et d'un diamètre de 4

20 mm vendue sous la dénomination Hypersil® BDS, d'une porosité de 3 µm, vendue par la société Tracer Analytica (Espagne), d'un détecteur à fluorescence RF 551 vendu par la société Shimadzu (Japon) muni d'une lampe xénon d'une puissance de 150 W réglé à une longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{\text{excitation}}$ ) de 332 nm et à une longueur d'onde d'émission ( $\lambda_{\text{émission}}$ ) de 462 nm, d'un intégrateur SP4290 vendu par la société Spectra

25 Physics (USA). La phase mobile est composée d'un mélange acétonitrile/eau/acide acétique (450/540/10 ; v/v) filtré sur membrane de 0.25 µm et dégazée à l'hélium pendant 15 minutes. Le débit de la phase liquide est fixé à 1 ml/min à une pression comprise entre 2000 et 3000 psi.

La quantité d'OTA totale adsorbée est obtenue par différence entre la quantité totale d'OTA présente dans le milieu initial et la quantité d'OTA présente dans le milieu final.

Dans cet exemple, les fibres végétales micronisées suivantes ont été utilisées : Realdyme® M, Realdyme® OF, et Realdyme® OM, et ce à différents dosages ;

## 2) Résultats

5 Les résultats obtenus sont reportés dans les tableaux I à IV ci-après ainsi que sur la figure 1 annexée.

Les pourcentages d'OTA adsorbées sur les fibres Realdyme® M en fonction de la durée de la mise en contact, avec le milieu modèle contenant 57 µg/l d'OTA, à un pH compris entre 6,0 et 6,2 sont reportés dans le Tableau I ci-après :

10

**TABLEAU I**

	Quantité de mycotoxines adsorbée (%)		
	Durée de la période de mise en contact (heures)		
Quantité de Realdyme® M (g/l)	3	24	48
0 (Contrôle)	0	0	0
10	46,7	52,5	49,8
16	59,8	65,3	61,6
20	68,9	69,7	71,7
30	68,0	72,3	73,6

Ces résultats montrent que l'adsorption des fibres ne varie pas entre 3 et 24 heures. Par ailleurs, la quantité d'OTA adsorbée augmente en fonction de la quantité de fibres présentes dans le milieu.

15

Les effets de durées de mise en contact inférieures à 24 heures sur le taux d'adsorption d'OTA (en %) par les fibres (20 g de fibres Realdyme® M par litre de milieu liquide modèle à pH 5,2 contenant 35 ng d'OTA/ml) sont reportés dans le Tableau II ci-après :

20

**TABLEAU II**

Durée de la mise en contact (en minutes)	% d'OTA adsorbé
0	0
5	21
15	20
45	25
90	29
169	28
360	30
1440	43

Ces résultats montrent que l'adsorption se produit très rapidement (entre 5 et 45 minutes environ) et que celle-ci se maintient au moins pendant toute la durée de l'expérience.

Les effets de la micronisation sur la capacité d'adsorption des fibres Realdyme® M et de leur matière première non-micronisée sont reportés dans le Tableau III ci-après :

**TABLEAU III**

Quantité de fibres (g/l)	Quantité d'OTA adsorbée (%)	
	Matière première non micronisées	Realdyme® M
20	17 %	33 %
30	22 %	37 %

10

Ces résultats montrent que la micronisation permet d'améliorer la capacité d'adsorption des fibres d'un facteur proche de deux.

La figure 1 annexée représente la capacité d'adsorption de trois fibres différentes (Realdyme® M : croix ; Realdyme® OF : ronds pleins et Realdyme® OM : triangles vides) en milieu DYT contenant une concentration initiale de 30 ng d'OTA/ml pour un volume initial de 25 ml et une durée de mise en contact de 45 minutes. On observe que la capacité d'adsorption des fibres Realdyme® M est la plus élevée, suivie de celle des fibres Realdyme® OM, et enfin celle des fibres Realdyme® OF.

15



Les résultats représentés sur la figure 1 montrent que même à des concentrations aussi faibles que 5 g de fibres par litre de milieu, on observe une bonne adsorption de l'OTA. en particulier avec les fibres Realdyme® M.

**EXEMPLE II : ETUDE DE L'EFFET DU pH SUR L'ADSORPTION DES MYCOTOXINES PAR DES FIBRES DE BLE**

Le pH du milieu est susceptible d'influencer l'adsorption de l'OTA sur les fibres car il influence la répartition des charges électriques sur les fibres, sur les toxines et dans le milieu. Au cours de la digestion, le pH du bol alimentaire diminue dans de larges proportions.

Afin d'étudier l'impact du pH sur la capacité d'adsorption des fibres, une expérience en milieu modèle a été réalisée, consistant en la mesure de l'adsorption avant et après une descente puis une remontée du pH.

**1) Protocole expérimental :**

Une quantité connue de fibres Realdyme® M correspondant à la concentration de 20 g de fibres/l est mélangée dans un tube stérile de 50 ml à 25 ml de milieu modèle DYP tel que décrit ci-dessus à l'exemple 1, préalablement contaminé à 50 ng d'OTA/ml au moyen d'une solution d'OTA dans de l'éthanol. Le pH du milieu est mesuré à 6.

Le contenu du tube est alors incubé, séparé, extrait, purifié et analysé comme décrit ci-dessus à l'exemple 1.

Parallèlement, le pH de ce même DYP est, dans deux autres tubes déjà garnis de fibres, abaissé jusqu'à une valeur de 2,2 par ajout d'acide lactique solide. Le contenu d'un des deux tubes est alors incubé, séparé, extrait, purifié et analysé comme décrit ci-dessus à l'exemple 1.

Le pH du milieu dans le deuxième tube est alors remonté à 4,8 par ajout de granules d'hydroxyde de sodium. Le contenu du tube est alors incubé, séparé, extrait, purifié et analysé comme dans l'exemple 1.

Chaque expérience est effectuée trois fois.

**2) Résultats :**

Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 2 annexée qui représente l'évolution de l'adsorption de l'OTA (diminution de la quantité d'OTA dans le milieu DYP en % de la quantité initialement présente) sur les fibres après la

descente et après la remontée du pH dans le milieu DYP. Sur cette figure, la barre noire correspond aux mesures effectuées à pH 6, la barre grise aux mesures effectuées à pH 2,2 et la barre blanche aux mesures effectuées après remontée du pH de 2,2 à 4,8.

- 5 Il est manifeste que plus le pH est bas, plus l'adsorption de l'OTA par les fibres est forte, atteignant même pour un pH de 2,2 un pourcentage d'adsorption de 82,4 %. Le relargage de la toxine lors de la remontée du pH ne semble pas être aussi fort que l'augmentation de l'adsorption lors de l'abaissement du pH.

- 10 La diminution du pH permet donc, pour une même quantité de fibres, d'augmenter de façon considérable la quantité d'OTA adsorbée par ces fibres.

**EXEMPLE III : MISE EN EVIDENCE DE L'ADSORPTION DES AFLATOXINES TOTALES (B1 + B2 + G1 + G2) PAR DES FIBRES VEGETALES INSOLUBLES**

- 15 Une quantité déterminée de fibres végétales (Realdyme® M : 20 g/l) est introduite dans un tube stérile de 50 ml et mélangée avec une solution de DYP (25 ml) telle que décrite ci-dessus à l'exemple 1, préalablement contaminée par les aflatoxines totales (720 ng/l). Après homogénéisation manuelle pendant 30 secondes, le tube est placé à agiter à 90 tours par minute dans une chambre thermostatée à 25°C pendant 45 minutes. Un traitement contrôle sans adsorbant a servi de témoin.

- 20 A l'échéance, la suspension est centrifugée à 1830g pendant 10 minutes à 25°C, puis le culot est séparé du surnageant. L'essai est réalisé trois fois.

- Les aflatoxines totales (initiales et résiduelles) sont analysées par une méthode immunochimique ELISA de compétition directe à l'aide du test spécifique quantitatif à haute sensibilité vendu sous la dénomination commerciale  
25 Veratox® HS par la société Neogen Corporation (USA). Le protocole préconisé par le fournisseur de ce test a été utilisé.

Ce test immunochimique (ELISA) a été réalisé de manière suivante :

- dépôt de 100 µl de conjugué dans chaque micropuits non tapissé d'anticorps :

1. 100 µl de standard (0, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 ng/ml) ou d'anticorps :

2. 100 µl de conjugué dans chaque micropuits non tapissé d'anticorps :

3. 100 µl de standard (0, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 ng/ml) ou d'anticorps :

- incubation pendant 10 minutes à température ambiante ;
- lavage cinq fois avec de l'eau désionisée ;
- dépôt de 100 µl de substrat ;
- incubation pendant 10 minutes à la température ambiante ;
- 5 - ajout de 100 µl de solution "Red Stop" fournie avec le test pour arrêter la réaction substrat-enzyme.

En parallèle, on réalise une courbe d'étalonnage avec un standard (0 à 1,6 ng d'aflatoxines /ml).

10 La densité optique des colorations est ensuite lue à une longueur d'onde de 620 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque vendu sous la dénomination commerciale Labsystem Multiscan MCC/340-RS232C (Labsystems, Finlande).

La limite de détection et la limite de quantification de cette méthode analytique sont respectivement estimées à 3 et 10 ppt alors que le pourcentage de récupération est de 100 %

15 Le résultat de cet essai révèle une diminution des aflatoxines totales due à leur adsorption sur le Realdyme M (2 %) de l'ordre de  $33,3 \pm 5,8$  % (n = 3) pour une contamination initiale de 720 ng/l contenue dans le milieu synthétique (DYP) à pH=6,0.

20 EXEMPLE IV : MISE EN EVIDENCE DE L'EFFET DE L'ADMINISTRATION D'UNE COMPOSITION ALIMENTAIRE COMPRENANT DES FIBRES VEGETALES MICRONISEES SUR LA DIMINUTION DE LA BIODISPONIBILITE DE L'OTA CHEZ LE RAT

25 Cet exemple a été réalisé dans le but de montrer que les effets observés *in vitro* notamment à l'exemple 1 ci-dessus en terme d'adsorption des mycotoxines par des fibres végétales sont conservés *in vivo* et permettent de diminuer la biodisponibilité des mycotoxines après ingestion d'un aliment contaminé.

30 Plus particulièrement, le présent exemple vise, d'une part, à évaluer l'effet de ces adsorbants biologiques sur les performances de croissance et sur la quantité des matières fécales chez des rats exposés à la toxine *via* une alimentation naturellement contaminée. D'autre part, il vise à évaluer l'effet protecteur de ces fibres sur les teneurs en OTA dans le sang et les organes.

De façon spécifique, cet exemple vise à :

- tester l'impact de l'incorporation des fibres de blé micronisées dans l'alimentation naturellement contaminée par l'OTA sur la croissance et l'évolution de la masse corporelle des rats exposés à la toxine ;

- tester l'impact de l'incorporation des fibres de blé micronisées sur la quantité des matières fécales éliminées en présence de l'OTA ;

- évaluer la capacité des fibres de blé micronisées à diminuer la quantité d'OTA dans le plasma sanguin et les reins des rats naturellement exposés à l'OTA.

### **I) Matériels et Méthodes**

#### **1) Produits**

- Potato-extract, Dextrose/Glucose et Gélose (agar-agar) (poudres) vendus par la société Scharlan Chemie S. A., Barcelone, Espagne ;

- Peptone en poudre (Duchefa, Haarlem, Pays-Bas) ;

- Ochratoxine A (O-1877) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, Etats-Unis) ;

- Toluène pour analyse (Lab Scan, Dublin, Irlande) ;

- Chloroforme (grade analytique) (Lab Scan, Dublin, Irlande) ;

- Ether (Labscan, Dublin, Irlande) ;

- Méthanol grade HPLC (Acros Organics, Geel, Belgique) ;

- Acétonitrile grade HPLC (Lab Scan, Dublin, Irlande) ;

- Tampon phosphate : Phosphate Buffer Saline-PBS (NaCl 120 mmol/l, KCl 2,7 mmol/l, phosphate buffer 10 mmol/l ; pH 7,4) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, Etats-Unis) ;

- Bicarbonate de sodium (Merck, Darmstadt, Allemagne) ;

- Chlorure de sodium (Merck, Darmstadt, Allemagne) ;

- Eau Milli-Q Plus (Millipore, Molsheim, France) ;

- Acide acétique 99-100 % pour analyse (UCB, Bruxelles, Belgique)

- Acide orthophosphorique (grade analytique) (UCB, Bruxelles, Belgique)

- Tubes polypropylène (Falcon) stériles de 15 et 50 ml (Greiner-Labortechnik, Frickenhausen, Allemagne) ;

- Colonnes d'immunoaffinité Ochratest ® (Vicom, Watertown, MA, Etats-Unis) ;

5 - Filtre de type Millex®-HV GVHP 04700 (0,22 µm) (Millipore, Bedford, MA, Etats-Unis) ;

- Filtre Acrodisk ® 13 mm pour seringues avec membrane en Nylon 0,45 µm (Pall Gelman Laboratory, Karlstein, Allemagne).

## 2) Appareils

10 - Support Vac-Elut ® (Analytichem International, Harbour City, CA, Etats-Unis) ;

- Ultraturax ® T-25 basic (IKA-Werke, Janke und Kunkel GMBH & Co, Staufen, Allemagne) ;

- Evaporateur Rotavapor <R> (Büchl, Flawil, Suisse) ;

15 - Centrifugeuse Jouan CR (Jouan, Saint Nazaire, France) ;

- Spectrophotomètre OPI - 4 (Shimadzu, Kyoto, Japon) ;

- Autoclave (Fedegari Autoclavi, Spa-Albuzzano-Pv, Italie) ;

- Système de chromatographie liquide haute performance (HPLC)

constitué de :

20 \* Pompe à régime isocratique : Perkin Elmer LC049 (Norwalk, CO, Etats-Unis), avec une boucle d'injection de 50 µl (Rheodyne, Cotati, CA, Etats-Unis) ;

\* Colonne : C18 de 150 mm x 4.0 Hypersil ® BDS (phase inverse), porosité 3 µm, (Tracer Analytica, Barcelone, Espagne) ;

25 \* Détecteur à fluorescence RF 551 (Shimadzu, Kyoto, Japon) à lampe xénon 150 W réglé à l'excitation : 332 nm et l'émission : 462 nm ;

\* Intégrateur Spectra Physics SP4290 (San Jose, CA, Etats-Unis) ;

\* Phase mobile : acétonitrile : eau : acide acétique (450 : 540 : 10), filtrée sur membrane (0.25 µm) et dégazée à l'hélium (15 minutes) ;

\* Débit : 1 ml / minute ;

30 \* Pression : 2900-3000 psi.

### **3) Fibres végétales micronisées**

Les fibres végétales testées sont les fibres de blé micronisées Realdyme® M (Realdyme, Garancières-en-Beauce, France) se présentant sous la forme de particules dont 87 % en poids ont une taille inférieure à 150 µm, essentiellement insolubles (85 %), composées d'hémicelluloses (60 %), de cellulose (35 %) et de lignine (5 %). Leur capacité de rétention d'eau est de 150 %.

### **4) Production d'Ochratoxine A**

L'alimentation des rats a été naturellement contaminée par l'OTA produite au sein du laboratoire de Biochimie de la Nutrition en étroite collaboration avec le laboratoire de mycologie de l'Unité de Microbiologie de l'Université Catholique de Liège (Belgique).

#### **4.1. Microorganisme**

L'OTA a été produite en cultivant la souche de *Penicillium verrucosum* (code MUCL : CWL 44468 de la Mycothèque de l'Université de Louvain la Neuve, Belgique) sur des grains de blé..

#### **4.2. Préparation de l'inoculum**

La souche a été revitalisée pendant une semaine par repiquage sur un milieu gélosé Potato-Dextrose-Agar (PDA) constitué d'un bouillon de potato-extract (0,4 %), de dextrose (2 %) et d'agar (1,5 %). Le PDA a été préalablement stérilisé à l'autoclave (15 min à 121°C), coulé en pente et conservé à +4 °C au réfrigérateur. Les conidies produites sur PDA au bout de 10 jours de culture ont été décollées aseptiquement à l'aide d'une anse stérile et mises en suspension dans de l'eau peptonée (9 %) stérile. Deux ou trois dilutions successives de 1/10 ont été indispensables pour le comptage des conidies par examen direct au microscope. Une charge de la suspension de 10<sup>4</sup> conidies/ml a été utilisée afin d'inoculer les grains de blé à la dose de 2 ml par 60 g.

#### **4.3. Culture**

La culture de la souche a été réalisée sur du blé tendre. Pour ce faire, l'humidité des graines de blé a été ajustée à 24-25% par addition d'un volume d'eau approprié. Les grains ont été placés dans des érlenmeyer de 100 ml contenant 60 g de grains. Les érlenmeyer ont été incubés à 25°C pendant 10 jours. Les grains ont été récoltés et analysés.

incubés à l'obscurité dans une chambre thermostatée à 22°C pendant 24 jours. A l'échéance, les échantillons ont été stérilisés comme précédemment, congelés et lyophilisés afin de faciliter le moulage. Une production totale de 2 kg de blé contaminé à raison de 1,8 µg d'OTA/g de blé a ainsi été obtenue.

#### 5 4.4. Composition et préparation des régimes

L'aliment de base pour les rats a été fourni par Carfil (Parvan Service PVBA Carfil quality, Oud-Turnhout, Belgique) par sacs de 15 kg. Il est principalement constitué de protéines (21 %), de matières grasses (4,5 %), de cellulose (4 %), de cendres (7,0 %), de vitamine A (20 000 IE/UI/kg), de vitamine D3 (2000 IE/UI/kg) et de vitamine E (40 mg/kg).

Partant de cet aliment standard, les trois régimes figurant dans le tableau IV ci-après ont été constitués :

**TABLEAU IV**

Régimes	Aliment de base (%)	Farine de blé (*) non contaminée (%)	Farine de blé contaminée à 1,8 µg d'OTA/g (%)	Fibres de blé micronisée
1	88	12	0	0
2	88	2	10	0
3	88	0	10	2

15 \*: La teneur en OTA dans la farine de blé de départ a été déterminée (teneur OTA < Limite de Détection (LD))

Pour chacun de ces régimes, les différents constituants sont intimement mélangés et pressés sous forme de granulés cylindriques (diamètre = 5 mm). Un stock de 10,8 kg d'aliments a été ainsi constitué pour chaque régime. La teneur en OTA a été déterminée sur un échantillon de chaque régime prélevé à trois différents moments de l'expérimentation. Les 3 sous-échantillons sont mélangés et moulus.

#### 5) Animaux et plan expérimental

25 Trente-six rats males de race Wistar/AF EOPS âgés de 9 semaines ont été fournis par le Centre d'élevage Janvier Laboratoire (Genest-St-Isle, France). A la réception, les rats ont été pesés (masse corporelle de départ variant entre 248,0 et

294,0 g avec une moyenne de  $268,6 \pm 10,5$  g), et répartis dans des cages individuelles étiquetées. Ils ont été stabulés dans une animalerie climatisée à 22°C, soumise à un cycle de lumière-obscurité (alternatif) de 12 heures.

Après une familiarisation de 7 à 12 jours aux conditions de l'animalerie, les rats ont été répartis au hasard en 3 cohortes ( $n = 12$ ).

### 5.1. Essais préliminaires

Les essais préliminaires ont été réalisés sur un échantillon de 4 rats supplémentaires de 3 mois, et visaient à la maîtrise des méthodes de prélèvements d'échantillons et d'analyse de l'OTA dans les plasma, foie et reins (par dopage). Ils visaient également la détermination des pourcentages de récupération de l'OTA pour les différentes méthodes analytiques mises au point au sein du laboratoire.

### 5.2. Plan expérimental

L'étude a été réalisée suivant un plan expérimental de cas-témoins : les 36 rats ont été répartis en 3 groupes, chaque groupe a reçu l'un des 3 régimes du tableau IV ci-dessus.

- Traitement 1 (Blanc) : Régime 1 non contaminé ;
- Traitement 2 (Témoin) : Régime 2 contaminé ;
- Traitement 3 : Régime 3 contaminé et incluant des fibres de blé micronisées.

Pour chacun des régimes, un rationnement systématique de 22 g d'aliments par jour et par rat a été délivré. Cette consommation reste juste en dessous de l'alimentation *ad libitum*. Les quantités d'aliments correspondant à une consommation de 48 heures ont été présentées aux rats tôt le matin, avant 8 heures (il est à noter que les rats n'ont pas été alimentés le jour du sacrifice). Les rats disposaient d'eau *ad libitum*.

Du point de vue hygiénique, la litière a été renouvelée systématiquement deux fois par semaine et les matières fécales éliminées ont été séparées et pesées.

Au cours du suivi, les rats ont été pesés tous les 3 jours jusqu'à la fin de l'étude. Les rats ont été sacrifiés par perfusion de 100 ml de solution de chlorure de potassium (KCl) dans le cœur. Les organes (foie, reins, cœur, sang) ont été prélevés et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.



ml, préalablement héparinisé. Après centrifugation à 1830 g pendant 20 min, le plasma sanguin (2,5 – 5 ml) a été récupéré et stocké à -20°C jusqu'à l'extraction de l'OTA. Les reins et le foie ont été pesés, congelés dans l'azote liquide (freeze-clamping) et immédiatement conservés à -80°C. Le reste de la carcasse a été conservé à -20°C.

## **6) Détermination de l'OTA dans les différentes matrices**

### **biologiques**

#### **6.1 Extraction de l'OTA dans les céréales et les granulés d'aliments**

L'extraction de l'OTA des céréales et des granulés d'aliments est basée sur la technique (ISO FDIS 1541.2) du Comité Européen de Normalisation (CEN/TC 275, 1998) de l'Union Européenne. Le protocole de cette technique est le suivant :

- Peser 50,0 g de farine dans un tube à centrifuger (préalablement nettoyé et séché) ;
- Ajouter 200 ml de chloroforme et 20 ml d'acide phosphorique (0,1 M, pH 3) ;
- Homogénéiser pendant 3 minutes à 13 500 tours par minutes (tpm) à l'aide d'un Ultraturax ® ;
- Centrifuger pendant 10 minutes à 820g à basse température (5-10°C) ;
- Récupérer toute la phase chloroformique ;
- Procéder à une deuxième extraction en répétant les points précédents ;
- Récupérer et combiner les deux phases chloroformiques ;
- Prélever 350 ml de la phase chloroformique récupérée ;
- Évaporer le chloroforme au rotavapor (30-40°C) ;
- Ajouter 100 ml de solution de carbonate de sodium (0,5 M, pH=9) au résidu d'évaporation ;
- Centrifuger pendant 10 minutes à 820g à basse température (5-10°C) ;

- Récupérer 20 ml de cette solution de bicarbonate et la purifier sur une colonne d'immunoaffinité conformément au protocole décrit au point 6.4 ci-après).

### 6.2. Extraction de l'OTA du plasma sanguin

- 5                   - Prélever 2,5 ml de plasma ;  
                   - Ajouter 20 ml de chloroforme et 10 ml d'acide phosphorique (0,1 M, pH 3) ;  
                   - Homogénéiser pendant 3 minutes à l'aide d'un Vortex ;  
                   - Centrifuger pendant 10 minutes à 820g à basse température (5-  
 10   10°C) ;  
                   - Récupérer toute la phase chloroformique à l'aide d'une pipette ;  
                   - Procéder à une deuxième extraction en répétant les points précédents ;  
                   - Récupérer toute la phase chloroformique à l'aide d'une pipette et  
 15   combiner les deux phases chloroformiques ;  
                   - Évaporer le chloroforme au rotavapor (30-40°C) ;  
                   - Ajouter 20 ml de solution de carbonate de sodium (0,5 M, pH=9) au résidu d'évaporation ;  
                   - Centrifuger pendant 10 minutes à 820g à basse température (5-  
 20   10°C) ;  
                   - Récupérer un volume de 15-20 ml de cette solution de bicarbonate et le purifier sur une colonne d'immunoaffinité selon le protocole décrit ci-après au point 6.4.

### 6.3. Extraction de l'OTA des reins

- 25                   - Peser 2,5 g de reins dans un tube à centrifuger ;  
                   - Ajouter 2 g de chlorure de sodium ;  
                   - Ajouter 50 ml de chloroforme et 20 ml d'acide phosphorique (0,1 M, pH 3) ;  
                   - Homogénéiser pendant 3 minutes à 13 500 rpm à l'aide d'un

- Récupérer la phase organique inférieure ;
- Procéder à une deuxième extraction en répétant les points précédents ;
- Prélever 350 ml de la phase chloroformique récupérée ;
- 5 - Évaporer le chloroforme au rotavapor, à une température comprise entre 30 et 40°C ;
- Ajouter 100 ml de solution de carbonate de sodium (0,5 M, pH=9) au résidu d'évaporation ;
- Centrifuger pendant 10 minutes à 820g à basse température (5-10 10°C) ;
- Récupérer un volume de 15-20 ml de cette solution de bicarbonate et le purifier sur une colonne d'immunoaffinité comme décrit ci-après au point 6.4.

#### 6.4. Purification sur colonne d'immunoaffinité (OchraTest®)

- Fixer la colonne sur un support Vac-Elut ® et la surmonter d'une 15 seringue de 20 ml grâce à un adaptateur ;
- Conditionner la colonne d'immunoaffinité avec 20 ml de solution de PBS ;
- Passer 15 - 20 ml des solutions de bicarbonate sur la colonne à un débit de 1 à 2 ml/min ;
- 20 - Laver la colonne avec 20 ml d'eau Milli-Q plus ;
- Récupérer l'OTA en éluant à l'aide de 2 ml de méthanol et 2 ml d'eau Milli-Q plus ;
- Faire passer 20 ml d'air à l'aide d'une seringue à travers la colonne en vue de récupérer l'entièreté de l'éluat.

#### 25 6.5. Détection et quantification par HPLC

##### 6.5.1. Préparation des standards

La poudre d'OTA est dissoute dans un mélange toluène/acide acétique (99/1 ; v/v), pour obtenir une solution-mère à partir de laquelle se prépare une solution-stock d'une concentration d'environ 20 µg/ml. La concentration exacte 30 de cette solution ainsi que sa pureté est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 332 nm contre un blanc constitué du mélange toluène/acide acétique (99/1 ; v/v).

La concentration exacte est calculée par la formule suivante (1) :

$$\text{OTA } (\mu\text{g/ml}) = (A_{332} * \text{PM}_{\text{OTA}}) * 100 / \varepsilon * d \quad (1)$$

5 dans laquelle :

-  $A_{332}$  = Absorbance à 332 nm,

-  $\text{PM}_{\text{OTA}}$  (poids moléculaire de l'OTA) = 403,2 g.mol<sup>-1</sup>,

-  $\varepsilon$  (coefficient d'absorption molaire) = 5440 l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> pour l'OTA,

10 - d (longueur de la cellule) = 1 cm.

Le balayage spectrophotométrique entre 190 et 400 nm permet de vérifier la pureté et la nature de la mycotoxine par la détermination de sa longueur maximale d'absorption. Les solutions sont conservées à -20°C.

15 La solution stock est diluée en des standards de 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 ng OTA /ml dans le mélange eau/méthanol (50/50 ; v/v) pour la détermination de la droite d'étalonnage. Leur conservation se fait à -20°C.

20 La linéarité des réponses des standards à l'injection a été testée en utilisant leurs déviations (D) par rapport à la moyenne des réponses normalisées ( $R_n$ ) suivant la méthode de Van Trip et Roos (Riklt report, "*Model for the calculation of calibration curves*", 1991, 91.02, 1-4) ; cette valeur moyenne correspondant à la réponse de 1 ng d'OTA /ml injecté à partir des standards de 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 ng OTA /ml, selon l'équation (2) suivante :

$$D = (R_i/C_i - R_n) * 100 / R_n \quad (2)$$

25

dans laquelle :

-  $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$  et

-  $R_n = [\sum R_i/C_i] / 6 = [R_1/C_1 + R_2/C_2 + R_3/C_3 + R_4/C_4 + R_5/C_5 + R_6/C_6] / 6$

### 6.5.2. Détection et quantification

Cent µl d'extrait filtré ont été injectés afin de remplir complètement la boucle d'injection dont la capacité est de 50 µl. La phase d'élution était composée d'un mélange acétonitrile/eau/acide acétique (540/450/10 ; v/v/v). La détection de l'OTA a été faite à 332 nm (excitation) et à 462 nm (émission). La concentration d'OTA a été déterminée par l'interpolation des hauteurs de pic sur la droite d'étalonnage au même temps de rétention.

Les limites de détection et de quantification des analyses chromatographiques de l'OTA ont été calculées en utilisant un rapport signal/bruit de fond qui vaut respectivement 3/1 et 10/1.

### **6.6. Confirmation par formation du méthyl-ester de l'ochratoxine A**

La méthode utilisée par Zimmerli B. et Dick R. (J. of Chromatography B, 1995, 666, 85-99) et par Studer-Rohr I. *et al.* (J. Food and Chem. Tox., 1995, 33, 341-355) a servi à la confirmation de l'identité de l'OTA. Elle consiste à dériver l'OTA en méthyl-OTA. 200 µl d'extrait filtré sont évaporés à sec. Le résidu est repris dans 2,5 ml de méthanol et 0,1 ml d'acide chlorhydrique concentré. Le récipient est fermé et laissé à température ambiante pendant une nuit.

Après évaporation à sec, le résidu a été reconstitué avec 200 µl d'un mélange méthanol/eau (50/50 ; v/v). Basé sur la quantité d'OTA non dérivatisée, le rendement de la dérivatisation est estimé à 89 %.

### 7) Caractéristiques de performance des méthodes analytiques

#### *Limites de détection*

Tenant compte de toutes les procédures analytiques (extraction, purification et quantification), les limites de détection sont estimées à 10 ng/kg pour les céréales, 20 ng/l pour le plasma et 20 ng/kg pour les reins.

#### *Pourcentages de récupération*

Les essais de récupération de l'OTA par dopage (contamination artificielle) offrent des valeurs de 89 % pour les céréales (contaminations initiales = 0,4 – 10 µg/kg, n = 9), 99,9 % pour le plasma (contamination initiale = 1 ng/ml, n = 3) et 100 % pour les reins (contamination initiale = 2 ng/kg, n = 3). Ces pourcentages

tiennent compte de la concentration en OTA initialement présente dans la matrice utilisée.

### **8) Traitement des données et analyse statistique**

La vitesse de croissance des rats a été calculée par différence entre  
5 deux masses corporelles consécutives, rapportée à la durée séparant les deux pesées selon l'équation (3) suivante :

$$\text{Vitesse de croissance} = (MC_{(J+\Delta J)} - MC_J) / \Delta J \quad (3)$$

10 dans laquelle :

- MC = Masse corporelle

- J = Jour de pesée

-  $\Delta J$  = différence de jours entre deux pesées consécutives

L'effet induit par les régimes contaminés a été évalué par l'écart des  
15 résultats obtenus par rapport au Régime 1 (Blanc).

La procédure d'analyse non paramétrique a été utilisée compte tenu de l'hétérogénéité des données obtenues. Le test de Kruskal Wallis a permis de réaliser l'analyse de variance des différents traitements. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour apprécier la différence entre les moyennes des masses corporelles des rats  
20 exposés aux régimes contaminés et celles des rats soumis au régime Blanc, au début et pendant les 4 semaines d'expérimentation alors que le test de Mann-Whitney a été exploité en vue d'apprécier la différence entre la moyenne d'un traitement et celle du Blanc ou du Témoin. Le test de corrélation de Spearman a été utilisé pour vérifier la consistance de la relation entre les teneurs d'OTA plasmatiques et rénales.

25 Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  standard de déviation. Les données ont été analysées par le logiciel statistique SPSS version 10.0 (1999). Les différences sont considérées comme significatives à  $p < 0.05$ .

### **II) Résultats**

#### **1) Consommation alimentaire et exposition des rats à l'OTA**

30 Les données de consommation de l'OTA sont présentées dans le tableau 1. Les données de consommation de l'OTA sont présentées dans le tableau 1.

TABLEAU V

Régimes	Traitements	Teneur en OTA dans le régime (µg/kg)	OTA totale ingérée * (µg)	Apport journalier en OTA (µg/kg de mc/jour)	
				Moyenne ± SD	Etendue
Régime 1	Blanc	14,8	9,120	2,9 ± 0,6	1,8 - 3,7
Régime 2	Témoin	194,5	119,787	38,0 ± 7,3	24,0 - 48,5
Régime 3	Fibres de blé	180,0	110,910	35,5 ± 6,9	22,3 - 45,4

\* : Durée d'exposition = 28 jours, Consommation journalière de 22 g

Ces résultats montrent que l'aliment de base utilisé (Carfil) est légèrement contaminé en OTA (14,8 µg/kg) et que les incorporations de farine naturellement contaminée dans les trois autres rations ont permis d'obtenir une contamination variant entre 180,0 et 216,7 µg OTA/kg avec une moyenne globale de 197,1 ± 18, 5 µg d'OTA/kg. Déjà, l'aliment de base servi à raison de 22 g par jour et par rat offre un apport journalier de 2,9 ± 0,6 µg/kg de masse corporelle (mc). Les trois autres rations servies à la même quantité exposent les rats à des apports journaliers moyens de 38,0, 35,5 et 43,7 µg OTA/kg de mc selon le régime.

## **2) Impact de l'incorporation des fibres de blé micronisées dans les régimes sur la quantité de matières fécales éliminées par les rats exposés aux différents régimes**

L'analyse de la variance des résultats obtenus est reportée sur les figures 3A et 3B annexées. La figure 3A représente la quantité cumulée de matières fécales éliminées (en g) en fonction des semaines pour chacun des régimes (barres grises : régime 1 ; barres hachurées : régime 2 et barres pointillées : régime 3). La figure 3B représente la variation relative de la quantité de matières fécales éliminées (en %) par rapport à celle observée pour les rats ayant reçu le régime 1, en fonction des semaines (barres grises : régime 2 ; barres hachurées : régime 3).

Ces résultats révèlent une différence significative dans les quantités de matières fécales excrétées par les rats soumis aux 3 régimes. Le test de comparaison multiple permet de distinguer trois classes ordonnées ci-après : rats soumis au régime 2 < rats soumis au régime 1 < rats soumis aux régimes 3.

L'administration répétitive de l'OTA *via* le régime 2 durant 28 jours, c'est-à-dire sans fibres de blé micronisées, diminue en permanence la quantité de

matières fécales excrétées (figure 3B). Par contre, l'ajout des fibres dans le régime augmente l'excrétion des matières fécales. En effet, ces fibres offrent une augmentation de l'ordre de 23,4 à 40,7 % par rapport au régime 2 présentant un niveau similaire de contamination en OTA. L'augmentation de la masse de selles est un des effets bien connus des fibres alimentaires.

### **3) Impact de l'incorporation de fibres de blé micronisées sur les organes et le plasma sanguin des rats exposés aux différents régimes**

#### **3.1. Influence de l'OTA sur la masse des organes (reins, foie)**

Les masses brutes et relatives du foie et des reins des rats exposés aux 3 régimes en fonction du temps sont reportées dans le tableau VI ci-après :

**TABLEAU VI**

Régime	Nombre de rats	Masse brute de		Masses relatives	
		Foie (g)	Reins (g)	Masse foie/mc	Masse reins/mc
1	12	12,2 ± 2,5	2,53 ± 0,18	3,14 ± 0,62	0,65 ± 0,05
2	12	11,4 ± 1,6	2,31 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,99 ± 0,36	0,61 ± 0,05 <sup>a</sup>
3	12	10,6 ± 0,8	2,11 ± 0,18 <sup>a, b</sup>	2,85 ± 0,26	0,57 ± 0,04 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> : Une différence significative est observée entre cette moyenne et celle des rats soumis au régime « Blanc » ( $p < 0,05$ )

<sup>b</sup> : Une différence significative est observée entre cette moyenne et celle des rats soumis au régime « Témoin » ( $p < 0,05$ )

Ces résultats montrent qu'aucune réduction significative ( $p = 0,385$ ) de la masse du foie n'a été observée en présence d'OTA. En effet, d'après les résultats obtenus, la masse moyenne du foie des rats exposés à l'OTA ne présente pas de divergence avec celle des rats non exposés. Pourtant, la littérature rapporte que la masse du foie augmenterait en présence de l'OTA (Krogh P., Nordisk Veterinaer Medicin, 1977, 29, 402-405 ; Rutqvist L. *et al.*, J. of Vet. Med., 1977, 24(3), 293-308 et Burns P. E. *et al.*, Res. in Vet. Sci., 1984, 36(1), 92-103). En ce qui concerne le régime avec fibres, l'analyse statistique des données obtenues a permis de montrer que



Par contre, en moyenne, la masse des reins a diminué de façon significative ( $p < 0,001$ ) en présence de l'OTA, que se soit en absence ou en présence des fibres de blé micronisées. Ce même phénomène a été observé par Raju M. V., British Poultry Sc., 2000, 41(5), 640-650 et par Son W. C. *et al.*, Tox. Let., 2003, 142, 19-27. En revanche, plusieurs études ont montré que l'OTA augmenterait la masse des organes comme les reins et foie. L'OTA affecterait essentiellement les tubules proximales des reins causant ainsi une sévère hypertrophie (Burns R. B., 1984, précité). Les mêmes signes morphologiques ont été observés auparavant par Krogh P., 1977, précité et par Rutqvist L. *et al.*, 1978, précité.

### 3.2. Influence de l'incorporation des fibres de blé micronisées sur les concentrations en OTA dans le sang et les reins

#### 3.2.1. Cas du plasma

Le tableau VII récapitule ci-après les teneurs brutes d'OTA dans le plasma, ainsi que celles rapportées aux apports totaux en OTA durant la période d'exposition des rats aux régimes naturellement contaminés.

**TABLEAU VII**

Régimes	Teneur en OTA dans le plasma sanguin		Teneur en OTA dans le plasma sanguin rapportée à la quantité totale d'OTA ingérée	
	ng/ml	% de diminution <sup>b</sup>	ng/ml/ $\mu$ g d'OTA ingérée	% de diminution
1	21,1 $\pm$ 39,0	-	2,3 $\pm$ 4,3	-
2	830,3 $\pm$ 411,9	-	6,4 $\pm$ 3,9	-
3	494,1 $\pm$ 186,3 <sup>a</sup>	40,5	4,5 $\pm$ 1,7	30,3

<sup>a</sup> : Une différence significative est observée entre cette moyenne et celle des rats soumis au régime 2 témoin ( $p < 0,05$ )

<sup>b</sup> : Pourcentage de la quantité d'OTA plasmatique des rats soumis au régime 3 rapportée à celle du régime 2 témoin.

Ces résultats montrent que les fibres de blé micronisées, exercent une activité significative sur la diminution de la quantité d'OTA dans le plasma sanguin. Il est à noter que l'incorporation des fibres de blé micronisées à la dose de 2 % dans l'aliment permet de diminuer de 40,5 % la concentration d'OTA dans le

plasma. Cette aptitude est aussi remarquée lorsque les teneurs sont rapportées aux quantités totales d'OTA ingérées pendant toute la période de l'expérimentation.

Par conséquent, l'incorporation de fibres de blé micronisées dans un produit alimentaire permet de diminuer significativement la biodisponibilité de l'OTA.

### 3.2.2. Cas des reins

Les teneurs d'OTA brutes rénales et celles rapportées aux apports totaux en OTA durant la période d'exposition des rats aux régimes naturellement contaminés sont présentées dans le tableau VIII ci-après :

10

**TABLEAU VIII**

Régimes	Teneur en OTA dans les reins		Teneur en OTA dans les reins rapportée à la quantité totale d'OTA ingérée	
	ng/g	% de diminution <sup>b</sup>	ng/g/μg d'OTA ingérée	% de diminution
1	3,6 ± 8,8	-	0,398 ± 0,967	-
2	76,2 ± 31,2	-	0,530 ± 0,342	-
3	51,3 ± 42,5 <sup>a</sup>	32,6	0,463 ± 0,356	12,7

<sup>a</sup> : Une différence significative est observée entre cette moyenne et celle des rats soumis au régime 2 témoin ( $p < 0,05$ )

<sup>b</sup> : Pourcentage de la quantité d'OTA rénale des rats soumis au régime 3 rapportée à celle du régime 2 témoin.

Ces résultats montrent que les fibres de blé exercent aussi une activité significative sur la diminution de la concentration de l'OTA dans les reins. Il est en effet à noter que l'incorporation de fibres de blé micronisées à la dose de 2 % dans l'aliment permet de diminuer de 32,6 % la concentration en OTA dans les reins.

20

La teneur en OTA dans les reins présente une relation linéaire avec la concentration d'OTA plasmatiques, illustrée par l'équation de régression suivante :

$$OTA_{\text{reins}} = (17,764 \pm 9,511) + (0,060 \pm 0,010) \cdot OTA_{\text{plasma}} \quad (r^2 = 0,700 \quad p < 0,0001).$$

Cette relation linéaire est illustrée par le graphique ci-dessous (Figure 10). Les données expérimentales sont représentées par des points noirs et la droite de régression par une ligne continue.

Si le rein est l'organe d'accumulation de l'OTA, les teneurs qu'on y retrouve sont des bons indicateurs de la contamination à laquelle l'organisme est réellement soumis pendant une période relativement longue. Les résultats expérimentaux présentés dans le Tableau IX ci-dessus sont donc particulièrement significatifs de l'effet des fibres végétales micronisées sur la diminution de la biodisponibilité de l'OTA après ingestion d'un aliment contaminé.

L'ensemble des ces résultats montrent par conséquent que les fibres végétales micronisées adsorbent et retiennent les mycotoxines non seulement dans des milieux liquides modèles mais également dans le chyme gastro-intestinal des animaux. La biodisponibilité des mycotoxines est ainsi diminuée.

Ces fibres sont des éléments naturels provenant de céréales, ce qui présente un avantage pour leur utilisation en alimentation animale ou humaine.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation de fibres végétales micronisées et essentiellement insolubles à titre d'ingrédient dans la préparation d'une composition alimentaire destinée à diminuer la biodisponibilité des mycotoxines chez l'homme ou l'animal lors de l'ingestion d'un aliment susceptible d'être contaminé par lesdites mycotoxines.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée par le fait que ladite composition alimentaire est destinée à diminuer la biodisponibilité des mycotoxines hydrophobes.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée par le fait que les fibres végétales sont choisies parmi les fibres issues :

- de végétaux alimentaires choisis parmi les céréales, les légumineuses, les plantes potagères et les fruits,
- de végétaux utilisés par l'industrie du papier choisis parmi les arbres, la canne à sucre, le bambou et la paille de céréale.

4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée par le fait que les fibres végétales issues de céréales sont choisies parmi les fibres de blé, d'orge, d'avoine, de maïs, de millet, de riz, de seigle, de sorgho, et leurs équivalents maltés.

5. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée par le fait que les fibres issues de végétaux alimentaires, autres que les céréales, sont choisies parmi les fibres issues des pommes, des poires, des grains de raisins, des graines de lupin et de soja, des tomates, des pois et du café.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que les fibres végétales se présentent sous la forme de microparticules dont 90 % en poids présentent une taille inférieure à 100  $\mu\text{m}$ .

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 6, caractérisée par le fait que la composition alimentaire est destinée à diminuer la biodisponibilité de l'Ochratoxine A, des aflatoxines, de la Fumonisine et/ou du deoxynivalenol, et que les fibres végétales micronisées sont choisies parmi les fibres de blé, les fibres d'avoine et leurs mélanges.

complément alimentaire et que la quantité de fibres végétales micronisées au sein dudit complément représente jusqu'à 100 % en poids du poids total dudit complément.

5 9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée par le fait que la quantité de fibres végétales au sein dudit complément est comprise entre 80 et 100 % en poids du poids total dudit complément..

10 10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée par le fait que la composition alimentaire est destinée à l'alimentation humaine et qu'elle se présente sous la forme d'un ingrédient alimentaire à ajouter au cours de la fabrication d'un produit alimentaire à raison de 0,1 à 40 % en poids par rapport au poids total dudit produit alimentaire.

15 11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée par le fait que la composition alimentaire est destinée à l'alimentation animale et qu'elle se présente sous la forme d'une matière première à ajouter à la ration alimentaire journalière qui est donnée aux animaux domestiques ou d'élevage ou à incorporer à titre d'ingrédient au cours de la fabrication d'un aliment complet pour animaux domestiques ou d'élevage à raison de 0,5 à 50 % en poids par rapport au poids total de la ration alimentaire ou de l'aliment complet.

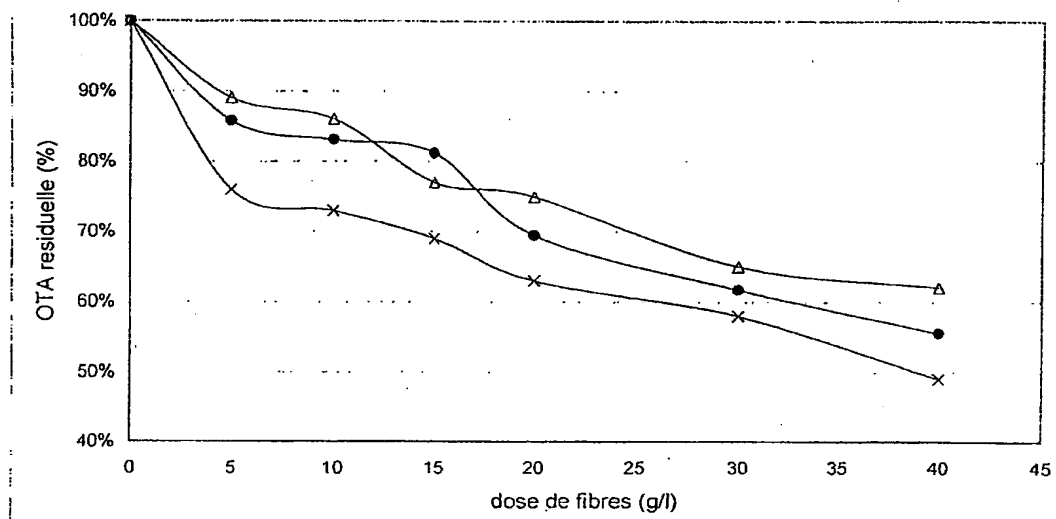


FIGURE 1

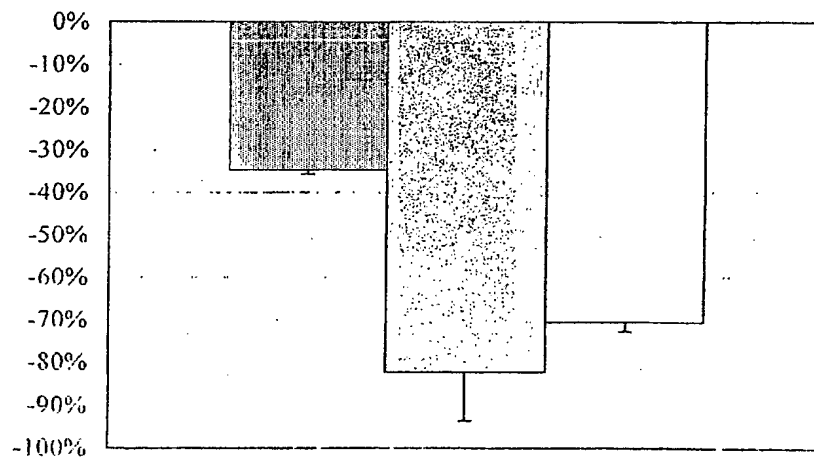


FIGURE 2

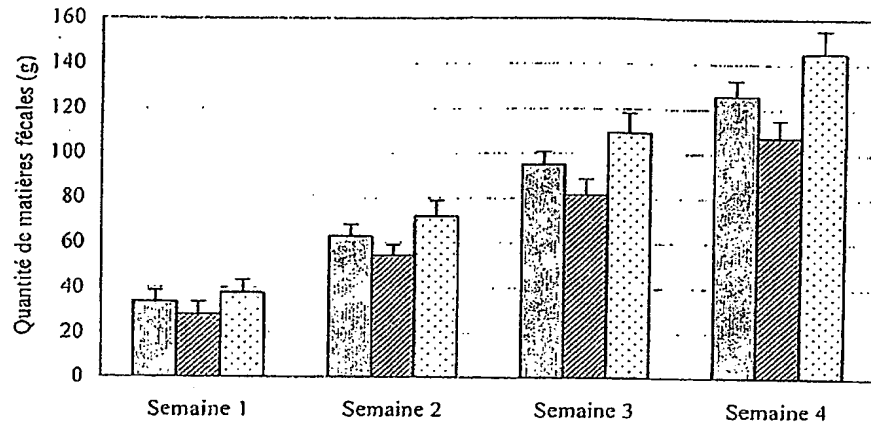


FIGURE 3A

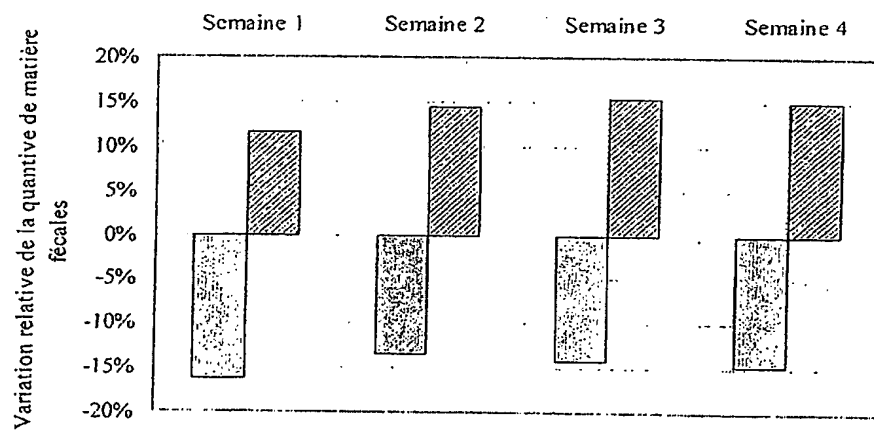


FIGURE 3B

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**DÉPARTEMENT DES BREVETS**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 @ W / 270601

Vos références (à compléter) (facultatif)		SGimF1708/2FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0400090
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
UTILISATION DE FIBRES VEGETALES MICRONISEES POUR LA PREPARATION D'UNE COMPOSITION ALIMENTAIRE DESTINEE A DIMINUER LA BIODISPONIBILITE DES MYCOTOXINES		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
REALDYME "La Haute-Epine" 28700 GARANCIERES-EN-BEAUCE France		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	TANGNI KOSSI
	Prénoms	Emmanuel
Adresse	Rue	27/202, Rue Charles de Loupoigne,
	Code postal et ville	11348 Louvain-La-Neuve - BELGIQUE
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	LARONDELLE
	Prénoms	Yvan
Adresse	Rue	67, avenue du Suffrage Universel,
	Code postal et ville	11030 Bruxelles - BELGIQUE
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	de MEEÛS d'ARGENTEUIL
	Prénoms	Ludovic
Adresse	Rue	Ferme de Géronvillers
	Code postal et ville	11450 Chastre - BELGIQUE
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

**DATE ET SIGNATURE(S)**

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU REPRÉSENTANT

(Nom et qualité du déposant)



**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

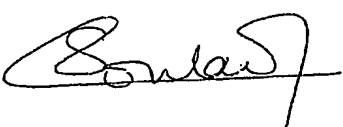
**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 @ W / 270601

Vos réponses doivent être données de façon impérative (obligatoire)		SGimF1708/2FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0400090
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) UTILISATION DE FIBRES VEGETALES MICRONISEES POUR LA PREPARATION D'UNE COMPOSITION ALIMENTAIRE DESTINEE A DIMINUER LA BIODISPONIBILITE DES MYCOTOXINES		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>  REALDYME "La Haute-Epine" 28700 GARANCIERES-EN-BEAUCE France		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b> Nom		AOUDIA
Prénoms		Nabilla
Adresse	Rue	24, rue du 5 Juillet
	Code postal et ville	El-Harrach
Société d'appartenance (facultatif)		Alger - ALGERIE
<b>2</b> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
  Sophie GOULARD N°02-0503		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

**PCT**

NOTIFICATION RELATIVE  
À LA PRÉSENTATION OU À LA TRANSMISSION  
DU DOCUMENT DE PRIORITÉ

(instruction administrative 411 du PCT)

Destinataire :

GOULARD, Sophie  
Cabinet Ores  
36, rue de St Pétersbourg  
F-75008 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 18 avril 2005 (18.04.2005)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire SGF1708/2PCT	<b>NOTIFICATION IMPORTANTE</b>
Demande internationale n° PCT/FR05/000020	Date du dépôt international (jour/mois/année) 06 janvier 2005 (06.01.2005)
Date de publication internationale (jour/mois/année)	Date de priorité (jour/mois/année) 07 janvier 2004 (07.01.2004)
Déposant REALDYME etc	

- Par le présent formulaire, qui remplace toute notification antérieure relative à la présentation ou à la transmission de documents de priorité, il est notifié au déposant la date de réception par le Bureau international du ou des documents de priorité concernant toute demande antérieure dont la priorité est revendiquée. Sauf indication contraire consistant en les lettres "NR", figurant dans la colonne de droite, ou un astérisque figurant à côté d'une date de réception, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
- (Le cas échéant) Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité qui, à la date d'expédition du présent formulaire, n'a pas encore été reçu par le Bureau international selon la règle 17.1.a) ou b). Lorsque, selon la règle 17.1.a), le document de priorité doit être présenté par le déposant à l'office récepteur ou au Bureau international, mais que le déposant n'a pas présenté le document de priorité dans le délai prescrit par cette règle, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) selon laquelle aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité considérée avant d'avoir donné au déposant la possibilité, à l'ouverture de la phase nationale, de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
- (Le cas échéant) Un astérisque (\*) figurant à côté de la date de réception, dans la colonne de droite, signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b) (le document de priorité a été reçu après le délai prescrit par la règle 17.1.a) ou la demande d'établissement et de transmission du document de priorité a été soumise à l'office récepteur après le délai prescrit par la règle 17.1.b)). Même si le document de priorité n'a pas été remis conformément à la règle 17.1.a) ou b), le Bureau international transmettra une copie du document aux offices désignés, pour leur appréciation. Dans le cas où une telle copie n'est pas acceptée par un office désigné comme document de priorité, la règle 17.1.c) énonce que aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité considérée avant d'avoir donné au déposant la possibilité, à l'ouverture de la phase nationale, de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Date de priorité	Demande de priorité n°	Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT	Date de réception du document de priorité
07 janvier 2004 (07.01.2004)	0400090	FR	30 mars 2005 (30.03.2005)

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé  Giffo Schmitt Beate
n° de télécopieur +41 22 740 14 35	n° de télécopieur +41 22 338 87 20 n° de téléphone +41 22 338 9241